

## PRODUCTION OF PHYSIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDE COMPOSITION

Veröffentlichungsnr. (Sek.) JP2000256394  
 Veröffentlichungsdatum : 2000-09-19  
 Erfinder : FUNATSU GUNKI; UEFUNE MASASHI; FUKUI MASARU  
 Anmelder : RHEOLOGY KINO SHOKUHIN KENKYUSHO:KK  
 Veröffentlichungsnummer : JP2000256394  
 Aktenzeichen:  
 (EPIDOS-INPADOC-normiert) JP19990069279 19990315  
 Prioritätsaktenzeichen:  
 (EPIDOS-INPADOC-normiert)  
 Klassifikationssymbol (IPC) : C07K2/00; A23L1/305; A61K7/00; A61K7/48; A61K31/00; A61K38/00; C07K1/14;  
 C12P21/00  
 Klassifikationssymbol (EC) :  
 Korrespondierende  
 Patentschriften JP3108059B2

### Bibliographische Daten

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To produce a composition containing a physiologically active peptide having angiotensin I converting enzyme inhibiting action and excellent safety and useful as a dermatologic preparation, cosmetic, or the like, by treating polished adlay flour under specific condition and treating the obtained acetic acid-treated product with a protease to reduce the molecular weight.

**SOLUTION:** About 90% acetic acid is added to polished adlay flour and stirred. Water is added to the mixture and the adlay flour is incubated by stirring in an acetic acid solution having a concentration of about  $\geq 30\%$ , preferably 50-30% at 10-50 deg.C for 0.5-2 hr. The acetic acid treated product is decomposed with pepsin and further depolymerized with one or more proteases selected from proleather(R), papain, bromelain and thermolysin to obtain the objective composition containing a physiologically active peptide. It is preferable to prepare health foods or drinks, dermatologic preparations or cosmetics by using the composition as an active component.

Daten aus der esp@cenet Datenbank - - I2

Best Available Copy

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-256394

(P2000-256394A)

(43) 公開日 平成12年9月19日 (2000.9.19)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームコード* (参考)
C 0 7 K 2/00		C 0 7 K 2/00	4 B 0 1 8
A 2 3 L 1/305		A 2 3 L 1/305	4 B 0 6 4
A 6 1 K 7/00		A 6 1 K 7/00	K 4 C 0 8 3
7/48		7/48	4 C 0 8 4
31/00	6 1 7	31/00	6 1 7 4 H 0 4 5
審査請求 有 請求項の数 3 O L (全 13 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平11-69279

(22) 出願日 平成11年3月15日 (1999.3.15)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成10年10月10日  
社団法人日本農芸化学会開催の「日本農芸化学会西日本  
支部大会」において文書をもって発表

(71) 出願人 599035339

株式会社 レオロジー機能食品研究所  
福岡県糟屋郡久山町大字久原2241-1

(72) 発明者 船津 軍喜

福岡市東区若宮4-14-48

(72) 発明者 上船 正史

福岡県粕屋郡久山町大字山田66-5 ハウ  
ス寺仙201号

(72) 発明者 福井 勝

福岡市東区原田4-4-5 シャルマンM  
i z o e 202

(74) 代理人 100075775

弁理士 戸田 親男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生理活性ペプチド組成物の製造法

(57) 【要約】

【解決手段】 植物種子等植物全般、その各部又はその  
1部、若しくはこれらの処理物、これらから得られた食  
品またはその処理物を酢酸処理して、組織を破壊、蛋白  
質を変成・可溶化し、必要に応じてプロテアーゼ処理し  
て蛋白質を低分子化して機能性ペプチドを作成し、水不  
溶性有効成分を水溶性化することを特徴とする生理活性  
ペプチド組成物の製造法。

【効果】 本生理活性ペプチド組成物は、ACE阻害作  
用、TNF- $\alpha$ 産生調節作用、活性酸素産生抑制作用、  
抗腫瘍作用等のすぐれた生理作用を有し、健康飲食品、  
外皮用剤、化粧品等の製造に利用できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 植物種子、樹皮、実部、莖部、根部、葉部等植物全般、その各部又はその1部、若しくはこれらの処理物を酢酸処理して、組織を破壊・蛋白質を変性・可溶化し、必要に応じてプロテアーゼ処理して蛋白質を低分子化して機能性ペプチドを作成し、水不溶性有効成分を水溶性化することを特徴とする生理活性ペプチド組成物の製造法。

【請求項2】 酢酸処理が、50～10%酢酸溶液中で、10～50℃、0.5～2時間の（攪拌）インキュベート処理であることを特徴とする請求項1に記載の製造法。

【請求項3】 プロテアーゼ処理が、ペプシン分解後、更に各種プロテアーゼによる低分子化処理であることを特徴とする請求項1に記載の製造法。

【請求項4】 請求項1～3のいずれか1項に記載の製造法によって得られる生理活性ペプチド組成物。

【請求項5】 請求項4に記載の生理活性ペプチド組成物を有効成分とする健康飲食品、外皮用剤、化粧品から選ばれる少なくともひとつ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、生理活性ペプチド組成物の製造に関するものであり、更に詳細には、植物種子等天然物由来の安全性の高い組成物であって、アンジオテンシンⅠ変換酵素（ACE）阻害作用、腫瘍壊死因子（TNF）-α産生調節作用、活性酸素産生抑制作用、抗腫瘍作用等優れた生理作用を有する組成物の製造に関するものである。

【0002】

【従来の技術】植物種子には生理活性成分を有するものが古来より各種知られており、例えばイネ科植物であるハトムギ（*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen*）（Roman）Stapfは、その殻を除いた種子（ヨクイニン）が生薬として使用され、利尿、消炎、排膿等に有効であるとされている（共立出版「化学大辞典7」第131頁）。しかしながら、これら天然物中においては、有効成分の多くは組織内にあるため、そのままでは水や有機溶媒での抽出量が少ないか、または抽出された脂溶性成分は水に溶解しないため、その使用法が限定され、用途によっては非常に大量に且つ長期間使用しなければならないし、余りにも速効性に欠けるという問題点は避けられない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記した技術の現状に鑑み、機能性食品や生薬に対する当業界のニーズも高いことから、有効成分を多量に含有する天然物由来の、生理活性を有する新規組成物を開発する目的でなされたものである。

【0004】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するため、本発明者らは各方面から検討した結果、生薬として用いられているヨクイニンに着目し、その起源であるハトムギについて、これを粉砕して酢酸で処理し、そのプロテアーゼ分解物の生理活性についての研究を行った。その結果、酢酸処理により水不溶性の蛋白質や組織構成成分が可溶化され、これをプロテアーゼで処理すると、その分解物にはTNF-α産生抑制作用、活性酸素産生抑制作用、抗腫瘍作用があり、高いACE阻害活性を有するペプチドが得られるという新知見を得た。

【0005】また、玄米並びに焼酎製造の副産物である大麦発酵エキスを乾燥物について検討した結果、それらの酢酸処理後のプロテアーゼ分解物が高収量で得られ、ACE阻害作用、TNF-α産生抑制作用及び活性酸素産生抑制作用があるという新知見を得た。更に、各種植物種子に含まれる成分の可成りのものが、この酢酸処理とプロテアーゼ処理によって水可溶化し、その抽出物に各種の生理作用があることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0006】本発明を実施するには、原料として植物種子、樹皮、実部、莖部、根部、葉部等植物全般、その各部又はその1部、若しくはこれらの処理物、これらから得られた食品又はその処理物を使用する。植物種子としては、ハトムギ、米、大麦、小麦、カラス麦、裸麦、ソバ、大豆、小豆、エンドウ、ソラ豆、落花生、インゲン、トウモロコシ、コウリヤン、ゴマ、アワ、ヒエ、ヒマワリ、麻の実、野菜の種子その他が挙げられる。その処理物としては、植物種子を脱殻したもの、それを粉砕したもの、糠類、ヨクイニン、そのヘキサン等による脱脂物、その水抽出残渣、そのアルコール等有機溶媒抽出物、その他植物種子の各種処理物が挙げられる。また、その処理物には、酒粕、オカラ、焼酎粕、醤油製造粕、澱粉製造粕、その他植物種子又はその処理物を加工、処理して飲食品を製造する際に副生するものも包含する。

【0007】次いで、原料を必要であれば乾燥粉砕した後、酢酸処理して蛋白質その他成分を溶解せしめ、プロテアーゼ処理して目的とする生理活性ペプチド組成物を得る。酢酸処理は、50～10%酢酸溶液中で、10～50℃、0.5～2時間、必要であれば攪拌しながら実施する。酢酸としては、90%食品添加用の合成酢酸、あるいは醸造酢を濃縮した濃厚酢酸を使用する。合成酢酸の場合、処理後に定法にしたがって酢酸を除去してもよい。

【0008】プロテアーゼ処理が、1種の酵素を用いるほか、2種以上の酵素を用いる処理も包含する。後者の場合、2種以上の酵素の同時併用処理のほか、2種以上の酵素を順次用いて処理してもよい。使用酵素としては、ペプシン、パバイン、プロメライン、プロレザー（ピオブラーゼ）、サーモライシン等、動植物や微生物起源のプロテアーゼが市販品を含め各種使用可能であ

る。

【0009】本発明に係わる生理活性組成物を製造する態様例としては、次のものが例示される。原料に水や熱水等を加え、必要に応じてホモゲナイズした後、これを濾過して濾液と残渣に分ける。残渣を酢酸処理した後、プロテアーゼ処理して得た分解物は、例えば清酒酒粕を原料とした場合、ACE阻害作用を有する組成物として利用できる。

【0010】また、原料のエタノール抽出液を、水に投入して水不溶性の蛋白質（プロラミンなど）を沈殿として得、これを酢酸処理後、プロテアーゼ処理して得た分解物は、例えばハトムギを原料とした場合、ACE阻害作用を有する組成物として利用できる。

【0011】本発明に係わる水可溶性組成物は、ACE阻害作用、TNF- $\alpha$ 産生抑制・誘導作用、活性酸素産生抑制作用、抗腫瘍作用等の各種生理作用を有し、しかも天然の食品関連植物由来であって、安全性にも問題がなく、したがって、通常の食品はもとより、各種の機能性食品（本発明においては飲料も含む）として利用することができる。その期待される機能性食品の非限定例としては、次のものが挙げられる。

【0012】（血液循環関連の機能性食品）

アンジオテンシンⅠ変換酵素（ACE）阻害作用：血圧上昇の抑制（軽症高血圧症の血圧を低下させ、健康人の血圧値に変動のないもの）、脳卒中予防効果（脳浮腫の予防効果）、心臓肥大の抑制効果、血管損傷の予防効果  
活性酸素産生の抑制作用、活性酸素消去能：動脈硬化の予防

食物繊維：血中コレステロールの低下

【0013】（免疫関連の機能性食品）

腫瘍壊死因子（TNF- $\alpha$ ）産生の抑制作用：アトピー性皮膚炎や関節炎の予防効果や体質改善  
TNF- $\alpha$ 産生の誘導・増強作用：Tリンパ球の増殖、Bリンパ球の抗体産生や分裂の促進

【0014】（ガン・老化関連の機能性食品）

抗腫瘍作用（ハトムギに含まれる coixenolid e）：ガンの予防

活性酸素産生の抑制作用：老化の予防

【0015】本発明に係わる組成物は、上記した生理活性を有し、これらの生理活性を利用した上記機能性食品として用いることができるほか、通常の飲食品、特定保健用飲食品、健康食品、健康飲料、栄養食品、その他各種タイプの飲食品として用いることができる。また、アトピー性皮膚炎用外皮剤、いぼとり、しみとり、美白等\*

\*を目的とした美白、美肌関連の機能性食品や化粧品としても利用することができる。

【0016】なお、この際、本組成物は固体状（粉末、顆粒状その他）、濃縮物、ペースト状、液状ないし懸濁状のいずれでもよい。本組成物は、そのまま飲食品として利用できることは勿論のこと、他の食品ないし食品成分と併用したりして、適宜常法にしたがつて飲食品として利用できる。例えば、本組成物を有効成分とし、これに甘味料、酸味料、ビタミン剤その他ドリンク剤製造に用いられる常用成分を用いて、健康ドリンクやスポーツドリンクに有利に製剤化することができる。

【0017】また、本組成物は、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等の剤型に製剤化することもできる。これらの各種製剤は、常法にしたがつて、本組成物を主剤とし、これに賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、矯味・矯臭剤等の医薬の製剤技術分野における通常の各種補助剤を用いて製剤化することができる。

【0018】本組成物は天然起源であり、しかも永年に亘って漢方薬や食品として使用されていたものを起源とするため、毒性は全くないか又は極めて低く、卓越した安全性を示し、ハトムギ由来の本組成物は、これをラットに対して1日当たり500mgを経口投与したが、急性毒性は認められなかった。したがって、本組成物（それを有効成分とする飲食品）は、その使用量に格別の限定はないし、たとえ高齢者、幼児、病弱者であっても長期間摂取することができる。以下、実施例について述べる。

【0019】

【実施例1】市販の精白ハトムギ200gを水に一夜浸漬した後、水を加えてホモゲナイズして攪拌後、濾過した。このようにして得た残渣（91g）に70%エタノールを加え、50℃で5時間攪拌しながらハトムギ・プロラミン（coixin）を抽出した。エタノール抽出液を大量の水に投入してcoixinを沈殿として、あるいは抽出液をスプレードライして粉末として得た。得られたcoixinは、同様にして分離したトウモロコシのプロラミン（zein）と異なり、無色・無臭であり、より利用価値が高いことがわかった。

【0020】得られたcoixinのアミノ酸組成（モル%）を、コメ及びトウモロコシのプロラミンのそれとともに表1に示す。この結果から、coixinにはグルタミンを除き、アラニン、ロイシン、プロリン等の疎水性アミノ酸が多量に含まれることがわかった。

【0021】

表1. 各種プロラミンのアミノ酸組成（モル%）

アミノ酸	ハトムギ	コメ	トウモロコシ
Asp	6.27	7.36	6.04
Glx	21.74	20.79	24.67

Ser	4.89	5.92	5.33
Gly	1.48	5.54	2.39
His	0.92	0.97	1.00
Arg	1.39	4.55	1.21
Thr	2.26	2.12	3.95
Ala	18.36	10.17	12.99
Pro	9.12	4.78	9.69
Tyr	3.15	7.81	3.42
Val	5.00	6.45	4.94
Met	1.06	0.08	1.45
Cys	-	-	1.07
Ils	2.68	4.48	3.77
Leu	16.90	13.20	13.69
Phe	4.83	5.16	2.00
Lys		0.08	1.00

## 【0022】

【実施例2】Coixinの溶解性に及ぼす酢酸濃度の効果を次のようにして調べた。Coixin粉末500mgに表2に示すような濃度と容積の酢酸溶液を加え、室温で1時間攪拌しながらインキュベートした後、水を加えて100ml（最終酢酸濃度5%）にした。遠心分\*

\* 離後、上清中の蛋白量をLowry法により測定し溶解度を算出した。得られた結果（表2）から明らかなように、coixinは25%以上、好適には40%以上の濃度の酢酸溶液に充分可溶化されることが立証された。

## 【0023】

表2. Coixinの溶解度及びプロテアーゼ分解度に対する前処理酢酸濃度の効果

添加した酢酸溶液		酢酸処理後 の溶解度 (%)	プロテアーゼ分解物	
濃度 (%)	容量 (ml)		溶解度 (%)	IC <sub>50</sub> (μg/ml)
0(pH2~4)	100	2~2.5	-	-
5	100	47	42	165
10	50	50	48	120
15	33.3	51	50	40
20	25	53	52	36
25	20	85	56	-
30	16.7	89	58	38
40	12.5	92	67	56

【0024】上記で得た酢酸処理coixin溶液に、酢酸濃度が5%になるように水を加えた後、1/50量のペプシン（消化力=1:100、和光純薬工業）を用い、37℃で20時間分解した。次いで、減圧濃縮し凍結乾燥後、水に溶解してpHを9.0に調節し、1/50量のプロレザー（天野製薬製）を用い、50℃で20時間分解した。得られた分解液をpH5に調節して比較的分子量の大きいペプチドを沈殿させた後、遠心分離して得た上清中のペプチド量をLowry法で測定した結果、表2に示すように、酢酸濃度が高い程ペプチドの量は多く、coixinのプロテアーゼ分解には高濃度の酢酸溶液による処理がより効果的であることがわかつ

た。

## 【0025】

【実施例3】分解物のACE阻害活性は、Yamamotoらの方法に従い、Hip-His-Leuを基質としアンジオテンシンI変換酵素によって生成される馬尿酸を定量して測定し、50%阻害に要する試料の濃度IC<sub>50</sub>によって表した。

【0026】各種濃度の酢酸溶液で処理したcoixinのプロテアーゼ分解物のACE阻害活性を図1に示す。15%以上の酢酸で処理したcoixinの分解物で高いACE阻害活性が得られ、その収量とACE阻害活性から、coixinの酢酸処理には15%以上のよ

り高い濃度の酢酸溶液が効果的であることが明らかになった。

【0027】

【実施例4】30%酢酸で処理したcoixinのペプシン/プロテナー分解物を製造し、Bio Gel P-10カラムによるゲル濾過に供し、ACE阻害作用について調べた。図2Aに示すように、coixinは小さい分子量のペプチドにまで分解され、それらの全ての画分にACE阻害作用があることがわかった。

【0028】

【実施例5】トウモロコシのプロラミンであるzein（サンエイ糖化社製）粉末1gに90%酢酸10mlを加え、50℃で2時間インキュベート後、酢酸濃度が5%になるまで水で希釈し、1/50量のペプシンを用い、37℃で20時間分解した。次いで、酢酸を除去した後、pHを8.0に調節し、1/50量のサーモライシンを用い、37℃で6時間分解した。分解物はpH7では全て可溶性で、そのIC<sub>50</sub>は50μg/ml、pH4では71%が可溶性で、そのIC<sub>50</sub>は38μg/mlであり、非常に高いACE阻害活性を示した。分解物のBio Gel P-10カラムによるゲル濾過パターンとACE阻害活性を図2Bに示す。Coixin同様、zeinは小さい分子量のペプチドにまで分解され、それらの全ての画分にACE阻害作用があった。Coixinの場合と異なり、管数63以降に小さいピークが現れたが、これは恐らくzeinに混在した色素と推定される。

【0029】

【実施例6】精白ハトムギ粉末250gに90%酢酸250mlを加えて攪拌後、同容の水を加えてホモゲナイズし、室温で1時間攪拌した。酢酸濃度が4.5%になるよう水で希釈し、1/100量のペプシンを加えて、37℃で20時間インキュベートした。酢酸除去後、1/100量のプロテナーを用い、pH9、50℃で20時間分解した。遠心分離して得られた上清を凍結乾燥して精白ハトムギ分解物とした。分解物の収量は64.4g（収量=25.8%）で、そのACE阻害活性IC<sub>50</sub>は460μg/mlであつた。

【0030】

【実施例7】上記で得た分解物のヒト末梢血好中球におけるTNF-α産生抑制作用、白血球における活性酸素産生抑制作用、及び抗腫瘍作用について調べた。

TNF-α産生抑制作用：まず、好中球浮遊液（1.0×10<sup>8</sup>細胞/ml）500μlの試料溶液を加え、37℃で1時間インキュベートした。次いで、終濃度が0.1μg/mlになるようにリボポリサッカライド（LPS）を添加して6時間インキュベートした後、培養上清を採り、産生されたTNF-α量をELISA法にて測定して調べた。

活性酸素産生抑制作用：まず、白血球浮遊液（0.5～

1.0×10<sup>8</sup>細胞/ml）100μlに試料溶液-HBSS-50μMルシフェリン溶液（20μl：730μl：50μl）を加え、37℃で140秒間インキュベートした。次いで、20μM f-Met-Leu-Phe（fMLP）を100μl添加して6分間インキュベートした後、産生された活性酸素量を測定して調べた。

抗腫瘍作用：5週令の雄マウス（ddy）の腹腔内に、0.25mlのSarcoma 180腹水腫瘍細胞浮遊液（8×10<sup>6</sup>細胞/ml）を移植した後、0.25mlの試料溶液（300mg/ml）を、毎日6日間連続投与して飼育した。試料投与群と対照群のマウス体重の経日の増加（腫瘍細胞増殖）を測定し、細胞移植後の生存日数を比較して、抗腫瘍作用の有無を判定した。

【0031】図3に示すように、精白ハトムギのプロテアーゼ分解物にはTNF-α産生と活性酸素産生を抑制する作用が認められ、その作用はいずれも濃度依存的であった。また、マウス腹腔内に投与したSarcoma 180腹水腫瘍細胞の増殖は抑制され、マウスに対して延命効果を示すことがわかった。これらの結果から、精白ハトムギのプロテアーゼ分解物中には、TNF-α産生抑制成分、活性酸素産生抑制成分、及び抗腫瘍成分が含まれることが立証された。

【0032】

【実施例8】分解物をBio Gel P-10カラムを用いたゲル濾過によって分画した結果、図4に示すように、分解物中には分子量の大きい成分の量は少なく、TNF-α産生抑制成分は低分子量の広い領域に亘って溶出された。

【0033】

【実施例9】市販の玄米（福岡産“夢つくし”）粉末250gを45%酢酸で1時間処理した後、水で10倍に希釈してペプシン分解（1/100量、37℃、20時間）を、次いでpH9.0でプロテナー分解（1/100量、50℃、20時間）を行った。可溶性成分を凍結乾燥した結果、51g（収量=20.4%）の分解物が得られた。そのACE阻害活性（IC<sub>50</sub>）は680μg/mlで、図5上に示すように、TNF-αの産生に対しては抑制作用と誘導作用を、白血球における活性酸素の産生に対しては抑制作用を有することがわかった。

【0034】分解物のゲル濾過の結果（図5下）から、分解物中には高分子成分は余り含まれず、玄米中の蛋白はかなり分解を受けていることがわかった。6つの画分に分画し、TNF-αと活性酸素の産生に及ぼす影響について調べた結果、TNF-αでは画分1、2（高分子成分）に誘導作用が、画分3～6（低分子成分）に誘導と抑制の両作用が認められ、活性酸素産生抑制作用は画分5に認められた。

【0035】また、各種試料の酢酸処理-ペプシン/プロテナー分解物のACE阻害活性（IC<sub>50</sub>）は、脱脂ハ

トムギ糠：1450  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、玄麦ハトムギ：880  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、ハトムギ70%エタノール抽出残渣：830  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、ハトムギ水抽出残渣：890  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、コメ糠：680  $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。一方、TNF- $\alpha$ 産生に及ぼす影響については、図6に示すように、脱脂ハトムギ糠に誘導作用と抑制作用が、コメ糠に誘導作用と促進作用が、その他には抑制作用のみが認められた。

【0036】

【実施例10】酒粕（株）いそのさわを熱水とともにホモゲナイズし、遠心分離により可溶性成分（約60%）と残渣（約40%）を得た。可溶性成分については、活性炭処理して非吸着成分と吸着成分に分画した。前者には、グルコース（92%）、アミノ酸（0.93%）、核酸（0.3%）及びニンヒドリン反応陽性の呈\*

\*味性成分が含まれ、後者には、主にペプチドが含まれ、そのACE阻害活性（ $\text{IC}_{50}$ ）は1.62  $\text{mg}/\text{ml}$ であった。

【0037】一方、残渣については、50%酢酸処理後、5%酢酸溶液（pH2に調節）中でペプシン（1/50、37℃、24時間）分解を、次いでpH9.0でプロレザー（1/50量、50℃、16時間）分解を行った。得られた分解物は、67%水可溶で、粗蛋白質（41.6%）、灰分（12.0%）、食物繊維（12.0%）を含み、そのアミノ酸組成（モル%）は、下記表3の通り、コメの不溶性蛋白質（プロラミンとグルテリン）並びに酵母に由来するものと推定され、優れた組成を有することがわかった。

【0038】

表3. 酒粕残渣プロテアーゼ分解物のアミノ酸組成（モル%）

アミノ酸	酒粕残渣 分解物	コメ	
		プロラミン	グルテリン
Asp	7.72	7.36	10.16
Glu	16.57	20.79	19.02
Ser	7.77	5.92	5.67
Gly	6.01	5.54	4.27
His	—	0.97	2.26
Arg	5.48	4.55	9.81
Thr	4.79	2.12	3.70
Ala	11.58	10.17	4.79
Pro	6.40	4.78	4.24
Tyr	3.62	7.81	5.28
Val	6.79	6.45	6.56
Met	0.92	0.08	1.25
Cys	0.63	0.00	0.94
Ile	3.72	4.48	4.38
Leu	9.73	13.20	8.05
Phe	4.74	5.16	5.77
Lys	3.52	0.08	3.86

【0039】上記によって製造した酒粕残渣プロテアーゼ分解物のACE阻害活性 $\text{IC}_{50}$ は200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、さらに、ヒトの血中コレステロールを減少させることがわかった。

【0040】

【実験例11】大麦発酵エキス乾燥物（三和酒類（株））を酢酸処理後、4.5%酢酸溶液中でペプシン分解（1/100量、37℃、24時間）、次いでpH9.0でピオブラーゼ（ナガセ生化学（株））分解（1/100量、50℃、16時間）を行った。得られた分解物のACE阻害活性（ $\text{IC}_{50}$ ）は440  $\mu\text{g}/\text{ml}$ で

あった。そのゲル濾過パターンを図7に示すが、画分4～7にTNF- $\alpha$ 産生抑制作用が認められた。

【0041】

【実施例12】実施例4で得たcoixinペプシン/プロレザー分解物のスプレードライ粉末10g、糖類150g、蜂蜜15g、アスコルビン酸1g、クエン酸0.5g、香料適量に水を加えて1kgとし、これを95℃で20分間殺菌し、100mlずつ無菌時にビンに充填して、健康ドリンクを製造した。

【0042】

【実施例13】実施例6で得た精白ハトムギのペプシン

／プロレザ分解物の凍結乾燥粉末を用いて、下記により化粧水及びクリームを製造したが、いずれの製品もアトピー性皮膚炎、しみぬきに効果があることがわかった。

【0043】次に示す化粧水用処方を用意した：

- (1) エタノール 5.0 (重量％、以下同じ)、  
 (2) 植物油 0.1、(3) ポリオキシエチレン硬化  
 ヒマシ油 0.5、(4) D-グルクロン酸ラクトン 1  
 0.0、(5) プロピレングリコール 5.0、(6)

実施例6の凍結乾燥粉末 2.0、(7) 防腐剤、香料 10  
 適量、(8) 精製水 全量100.0

【0044】先ず(1)～(4)を溶解し、これを  
 (5)～(8)の溶液に加えて溶解し、化粧水とした。

【0045】次に示すクリーム用処方を用意した：

- (1) ワセリン 2.5 (重量％、以下同じ)、(2)  
 流動パラフィン 10.0、(3) セトステアリアル  
 コール 12.0、(4) ポリオキシエチレンソルビタ  
 ンモノステアレート 7.0、(5) ソルビタンモノス  
 テアレート 1.0、(6)  $\alpha$ 、 $\beta$ -グルコオクトニック  
 - $\gamma$ -ラクトン 2.0、(7) プロピレングリコール 20  
 5.0、(8) 実施例6の凍結乾燥粉末 1.0、  
 (9) 防腐剤、香料 適量 (10) 精製水 全量1  
 00.0

【0046】(1)～(6)の油層、(7)～(10)  
 の水層をそれぞれ75℃に加熱し、混合乳化する。これ  
 を30℃にまで冷却してクリームを製造する。

【0047】

【発明の効果】本発明に係わる組成物は、天然由来であ  
 って、しかもACE阻害作用、TNF- $\alpha$ 産生調節作  
 用、活性酸素産生抑制作用、抗腫瘍作用等優れた生理作 30  
 用を有する。しかも、安全性も高いため、本発明に係わ\*

\*る組成物は、通常の飲食品は勿論のこと、機能性飲食  
 品、外皮用剤、化粧品として有効利用される。

【図面の簡単な説明】

【図1】酢酸処理coixinのペプシン／プロレザ分解物のACE阻害活性に及ぼす処理酢酸濃度の影響を示す。(a)：5%酢酸処理、(b)：10%酢酸処理、(c)：15%酢酸処理、(d)：20%酢酸処理、(e)：30%酢酸処理、(f)：40%酢酸処理。

【図2】Coixinのペプシン／プロレザ(20時間)分解物(A)とzeinのペプシン／サーモライシン(6時間)分解物(B)の水中におけるBio Gel P-10カラム(2×26cm)によるゲル濾過パターンを示す。

【図3】精白ハトムギのペプシン／プロレザ分解物のTNF- $\alpha$ 産生と活性酸素産生に及ぼす影響、並びに抗腫瘍作用による延命効果を示す。

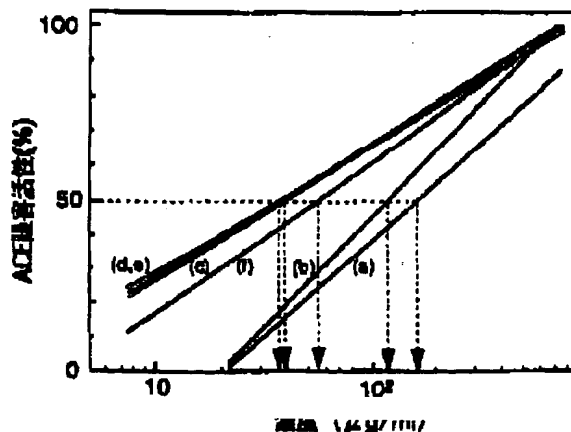
【図4】精白ハトムギのペプシン／プロレザ分解物のBio Gel P-10カラム(2×26cm)によるゲル濾過パターン(上図)と各画分のTNF- $\alpha$ 産生に及ぼす影響(下図)を示す。

【図5】玄米のペプシン／プロレザ分解物のTNF- $\alpha$ 産生と活性酸素産生に及ぼす影響(上図)、並びにBio Gel P-10カラム(2×26cm)によるゲル濾過パターン(下図)を示す。

【図6】各種ペプシン／プロレザ分解物のTNF- $\alpha$ 産生に及ぼす影響を示す。

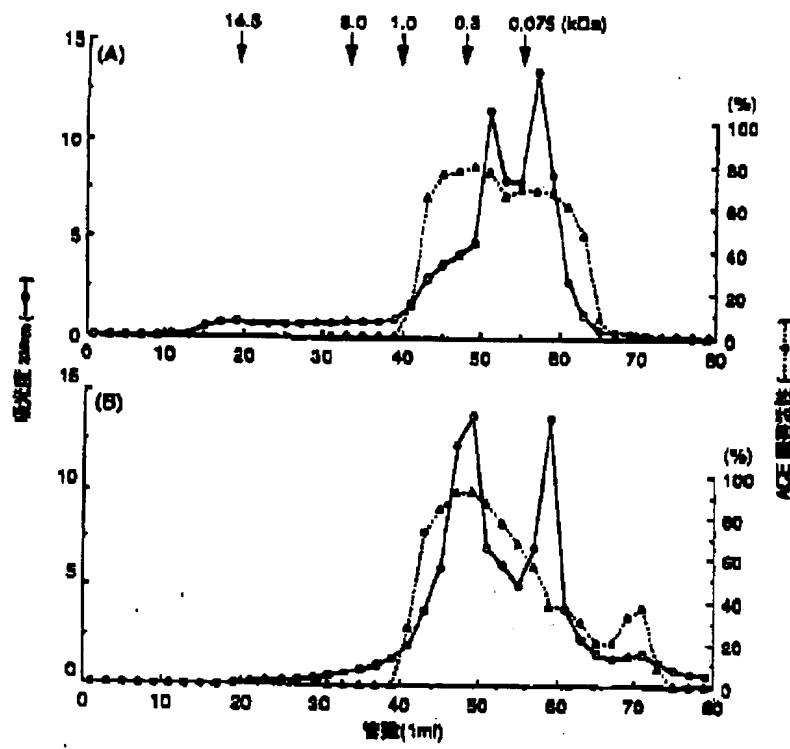
【図7】大麦発酵エキス乾燥物のペプシン／プロレザ分解物の水中におけるBio Gel P-10カラム(2×26cm)によるゲル濾過パターン(上図)と各画分のTNF- $\alpha$ 産生に及ぼす影響(下図)を示す。

【図1】

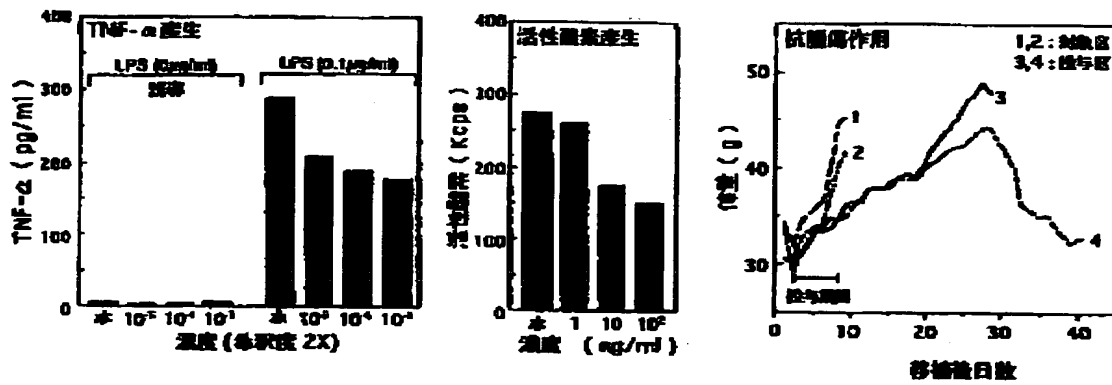




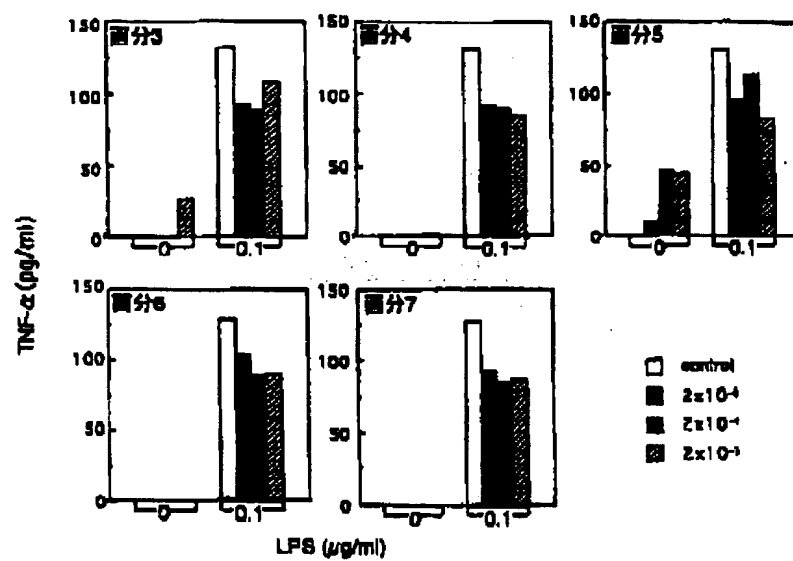
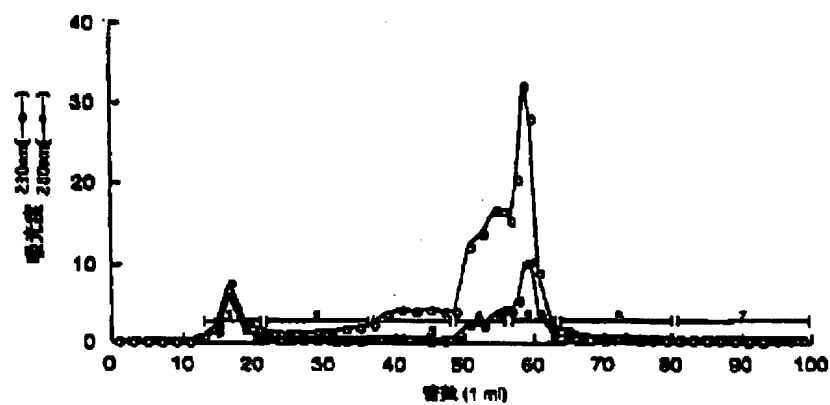
【图2】



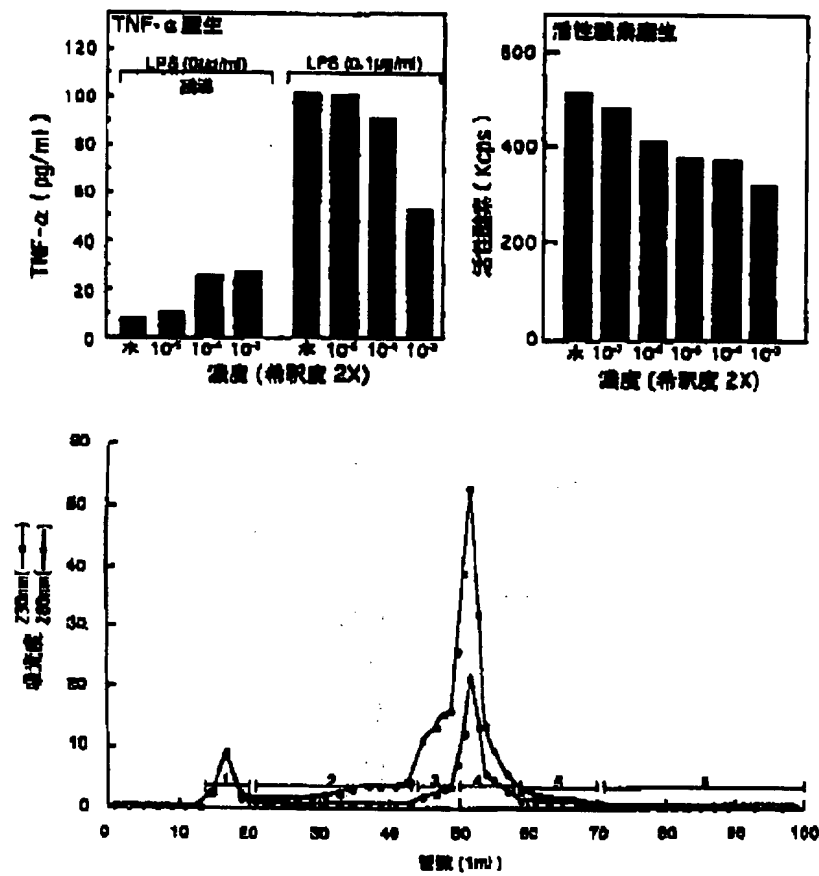
【图3】



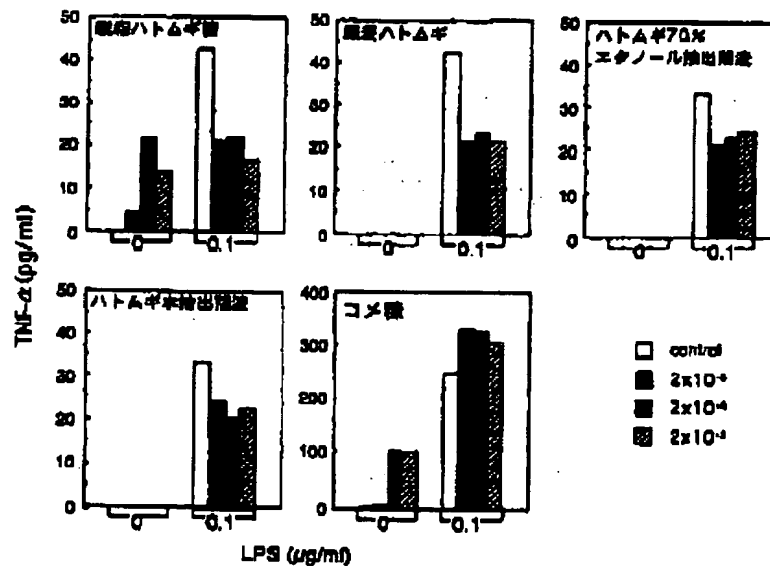
【図4】



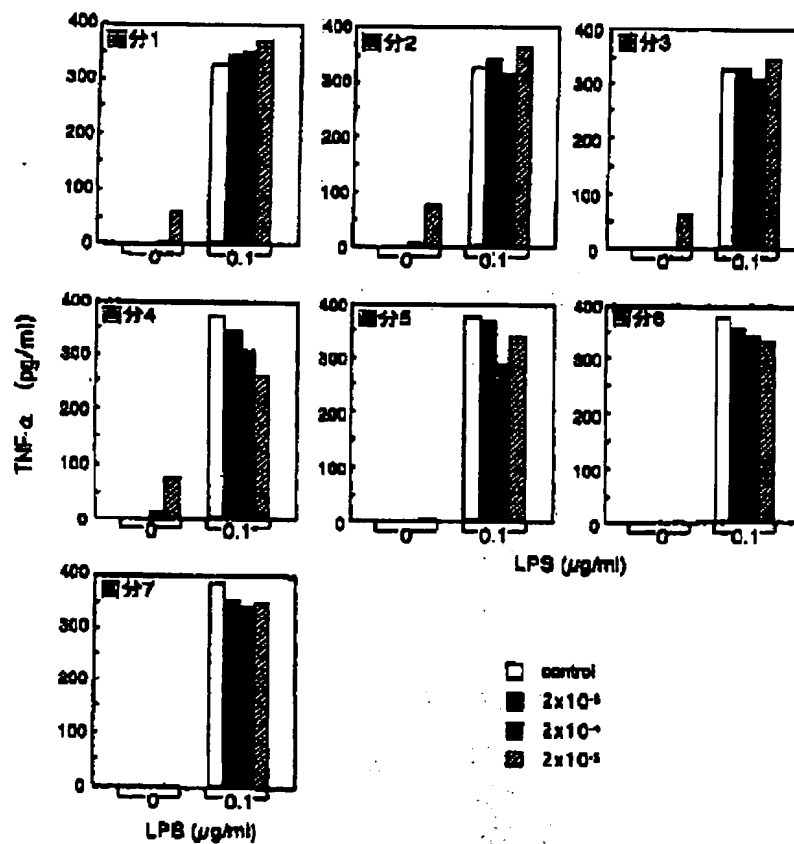
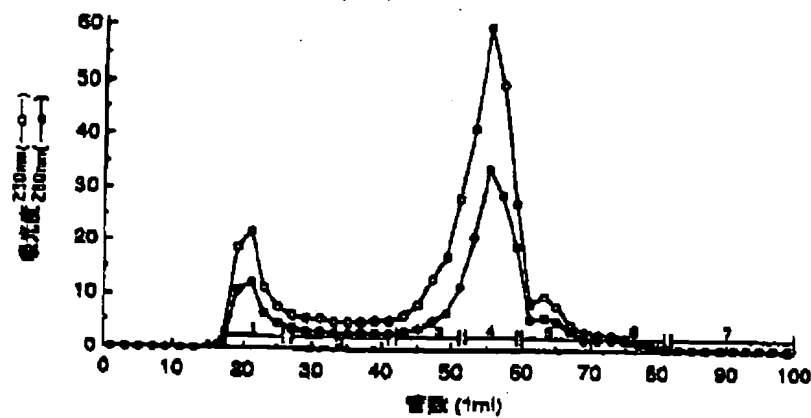
【図5】



【図6】



【図7】



【手続補正書】

【提出日】平成11年3月15日(1999. 3. 15)

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 植物種子、樹皮、實部、莖部、根部、葉部等植物全般、その各部又はその1部、若しくはこれら

の処理物、これらから得られた食品又はその処理物を酢酸処理して、組織を破壊・蛋白質を変性・可溶化し、必要に応じてプロテアーゼ処理して蛋白質を低分子化して機能性ペプチドを作成し、水不溶性有効成分を水溶性化することを特徴とする生理活性ペプチド組成物の製造法。

【請求項2】 酢酸処理が、50～10%酢酸溶液中で、10～50℃、0.5～2時間の（攪拌）インキュベート処理であることを特徴とする請求項1に記載の製\*

\* 造法。

【請求項3】 プロテアーゼ処理が、ペブシン分解後、更に各種プロテアーゼによる低分子化処理であることを特徴とする請求項1に記載の製造法。

【請求項4】 請求項1～3のいずれか1項に記載の製造法によって得られる生理活性ペプチド組成物。

【請求項5】 請求項4に記載の生理活性ペプチド組成物を有効成分とする健康飲食品、外皮用剤、化粧品から選ばれる少なくともひとつ。

#### 【手続補正書】

【提出日】平成12年4月7日（2000. 4. 7）

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 精白ハトムギ粉末に約90%の酢酸を加え、攪拌し、水を加え、約30%以上の酢酸溶液中でインキュベイト処理し、得られた酢酸処理物をプロテアーゼ処理し、低分子化した機能性ペプチド含有物を得るこ※

※とを特徴とする生理活性ペプチド含有物の製造法。

【請求項2】 約30%以上の酢酸溶液中でのインキュベイト処理が約50～30%酢酸溶液中で、10～50℃、0.5～2時間の攪拌処理であることを特徴とする請求項1に記載の製造法。

【請求項3】 プロテアーゼ処理が、ペブシン分解後、更にプロレザー、パバイン、プロメライン、サーモライシンから選ばれる少なくともひとつのプロテアーゼによる低分子化処理であることを特徴とする請求項1～2のいずれか1項に記載の製造法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

ターマコード（参考）

A 6 1 K 31/00  
38/00  
C 0 7 K 1/14  
C 1 2 P 21/00

6 3 5

A 6 1 K 31/00  
C 0 7 K 1/14  
C 1 2 P 21/00  
A 6 1 K 37/02

6 3 5

A

F ターム(参考) 4B018 LB08 LB10 LE01 LE02 LE03  
LE04 LE05 MD09 MD25 MD27  
MD48 MD49 MD50 MD56 MD57  
MD77 ME04 ME06 ME08 MF01  
MF12  
4B064 AG01 BE01 BE13 CA21 CB05  
CE02 CE03 CE07 CE08 DA03  
DA05 DA06 DA08 DA10 DA20  
4C083 AA122 AC012 AC022 AC072  
AC102 AC122 AC432 AC442  
AC842 AD411 AD412 CC04  
CC05 EE12 EE16 FF01  
4C084 AA02 AA03 AA06 CA14 DA27  
MA17 MA28 MA52 MA63 ZA892  
ZB262 ZC022 ZC202  
4H045 AA10 AA20 AA30 CA30 CA31  
CA32 CA33 EA01 EA15 EA20  
EA22 EA23 EA27 EA28 FA16  
FA65 FA70 GA01 GA05 GA15  
GA22 HA31 HA32

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**